

## Válasz Dr. Szabados László opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Szabados Lászlónak az értekezésem gyors és pozitív elbírálását. Az elírásokért -természetesen- elnézést kérek.

### Válasz a bíráló kérdéseire, megjegyzéseire.

#### 1. A silencing szupresszor fehérjék szelektivitása.

*1/a Van-e szekvencia specifitása a a CymRSV vírus P19 fehérjéje és a PoLV vírus P14szupresszor fehérjék dsRNS kötésének?*

*Az EMSA kísérletekben a ds siRNS szekvenciák megegyeztek (a mérethatárig) vagy különbözőek voltak?*

Jelenlegi ismereteink szerint egyik dsRNS-kötő szupresszornak, így a P19-nek, illetve a P14-nek sincs szekvencia-specifitása. Igazolták, hogy a P19 a ds siRNS cukor-foszfát gerincét köti, így érthető, hogy miért nem szekvencia-specifikus a P19 ds siRNS kötése (Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. Vargason JM, Szittyá G, Burgyán J, Hall TM. *Cell*. 2003 Dec). A P14 valószínűleg szintén a cukor-foszfát gerincet köti. A dsRNS kötési kísérletekben használt kis RNS-ek többsége (a 19 nt dsRNS, illetve a 21 és a 26 nt ds siRNS-ek) szekvenciálisan hasonló volt, míg a hosszú dsRNS minták eltérő szekvenciákból származtak.

*1/b Amennyiben a szupresszálas csak a dsRNS mérettől függ, akkor a szupresszorok hatása nagyon széles körű kell hogy legyen. Egy p19 típusú szupresszor ezt a nat-siRNS szabályozási rendszert alapvetően befolyásolhatja. Van-e arra adat, bizonyíték, hogy a p19 faktor befolyásolja a nat-siRNS rendszert?*

A P19 esetén a dsRNS kötés valóban csak a kétszálú RNS régió méretétől függ, míg más ds siRNS-kötő szupresszorok, így pl. a Hc-Pro vagy a P21 esetén a hatékony ds siRNS kötéshez elengedhetetlen a 3' végi túlnyúló szekvencia is.

A szensz és antiszensz orientációjú transzkriptumokról képződő cis-nat siRNS-ek igen gyakoriak, ugyanakkor eddig csak a só stressz és a bakteriális patogén válaszbán, illetve a hímivar-sejt fejlődésben játszott szerepét igazolták. Eddig nem talákoztam olyan közleménnyel, amely a virális szupresszorok nat-siRNS-eket gátló hatásáról számolt volna be.

*1/c Van-e a növényekben a vizsgált szupresszorokhoz hasonló regulátor gén/fehérje?*

*Számos olyan fehérje ismert, amely a silencing rendszer hatékonyságát csökkenti, így felfogható „endogén” silencing szupresszorként?*

Több olyan növényi fehérje is ismert, amely a silencing rendszer egyes elemeinek működését gátolja. A legismertebb ilyen talán az 5'-3' exonukleáz aktivitással rendelkező XRN fehérje család, amely az 5'-végen sapkát, cap-et-et nem viselő hibás mRNS-ekért versenyez a géncsendesítésben szerepet játszó RdRP (RDR) fehérjékkel. Az XRN fehérjék tehát a géncsendesítés amplifikációs rendszerét gátolják, így a silencing rendszer negatív regulátoraiként működhetnek. (Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. Gy I, Gasciolli V, Lauressergues D, Morel JB, Gombert J, Proux F, Proux C, Vaucheret H, Mallory AC. *Plant Cell*. 2007 Nov).

*1/d Van-e és mi a P19 (esetleg más hasonló szupresszorok) hatása a gazdanövény génexpressziós mintázatára, ezáltal fejlődésére, életműködésére?*

A géncsendesítés egy összetett szabályozási rendszer, amely részt vesz az antivirális válaszon kívül a normál génszabályozásban is. Mivel ezek az útvonalak átfednek, a virális szupresszorok megzavarhatják a normál egyedfejlődéshez szükséges kis RNS szabályozta folyamatokat is. Valószínű, hogy a vírusok által okozott tünetek jelentős része is arra

vezethető vissza, hogy a vírus fertőzött növényekben felborul a normál kisRNS reguláció. Mivel a konkrét hatás a vírus-gazda kapcsolattól, illetve a környezeti tényezőktől egyaránt függ, a kisRNS szabályozási rendszer felborulására visszavezethető tünetek igen változatosak lehetnek. Természetesen igen sok közlemény foglalkozik a vírus fertőzött növények megváltozott génexpressziójával, azonban ezekben az esetekben nehéz elkülöníteni a szupresszorok hatását a többi virális fehérje hatásától. Szintén sokan, sokféleképpen elemezték a szupresszorokat expresszáló transzgénikus növények génexpressziós mintázatát. Ezekben a növényekben a miRNS szabályozás alapvetően megváltozik, ami erős fenotípust eredményez. Ezek az eredmények azonban félrevezetőek lehetnek, ezekben a növényekben ugyanis a szupresszor minden sejtben, folyamatosan expresszálódik, míg vírus fertőzés során a szupresszor expressziója térben és időben korlátozott (Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. Lózsá R, Csorba T, Lakatos L, Burgyán J. Nucleic Acids Res. 2008 Jul). Ráadásul a szupresszor hatását a virális fehérjékkel történő kölcsönhatása szintén lényegesen módosíthatja.

## **2. A szupresszor mutációk hatása.**

*A Tombus és az Aureus vírusokban a szupresszort kódoló ORF5 és a MV fehérjét kódoló ORF4 ugyanazon lokusz reverz komplementer szálain található. A vizsgált Cym19stop illetve PoLVd14 mutációk természetesen a komplementer ORF4-en kódolt MV fehérjét is befolyásolhatják. Van-e adat arra, hogy a mutáns MV fehérjék működése megváltozott-e. Ki lehet-e zárni, hogy a mutáns MV-k is befolyásolhatták a megfigyelt fenotípusos változásokat?*

A Tombus- és Aureusvírusok esetén az ORF4 és az ORF5 régiók átfedőek, de nem reverz komplementerek. Az ORF5 az ORF4-be ágyazódik. Valószínűleg az ORF4 és az ORF5 translációja is a subgenomikus 2 RNS-ről történik, az ORF4 normál scanning mechanizmus szerint, míg az ORF5 a leaky-scanning mechanizmus szerint transzlálódik. Azaz, az ORF4 start kodonja kedvezőtlen kontextusban van, így a transláció gyakran nem kezdődik el az ORF4 start kodonjánál, a riboszóma kis alegysége tovább vándorol és csak az ORF5 start kodonjánál szerveződik meg a translációs iniciációs komplex.

A Cym19stop és a PoLVΔ14 mutánsokban az ORF4 által kódolt MV protein aminosav sorrendje változatlan, így igen valószínű, hogy a mutáns vírusok megváltozott fertőzőképessége a szupresszorok hiányával magyarázható.

## **3. A silencing szupresszió hőmérséklet függése.**

A növényi antivirális silencing rendszer hőmérsékletfüggő, alacsony hőmérsékleten kevésbé aktív, míg magas hőmérsékleten igen hatékony. Az ábrán jól látható, hogy 27°C-on a silencing képes volt megvédeni a növényt a CymRSV-től, míg alacsony hőmérsékleten még a szupresszor nélküli vírus is sikeresen fertőzött. A 21 és a 24°C fertőzés szempontjából hasonló, a vad vírus mindkét hőmérsékleten elpusztította a gazdát, míg a silencing rendszer a mindkét hőmérsékleten meg tudta védeni a növényt szupresszor nélküli vírustól.

*A hőmérséklettől függő géncsendesítés miatt a nekrosis mértékének fokozatosan csökkennie kellene a magasabb hőmérsékleteken.*

Eltérő hőmérsékleten a fertőzés dinamikája különböző. A fertőzés 15 és 21 °C-on lassabb, mint 24 °C-on, így a vírus némileg lassabban öli meg a gazdát, de az eredmény nem különbözik. Ezzel szemben 27 °C-on a gazda kigyógyul a fertőzésből. Érdemes kiemelni, hogy szinte minden patogén válasz hőmérsékletfüggő, de a silencing rendszertől eltérően, magas hőmérsékleten a védekezési válasz általában gyengül. Ez igaz pl. a *Nicotiana tabaccum* N-génes TMV vírus rezisztenciájára, a TMV ellenállóság a hőmérséklet emelésével

gyengül, 30 °C felett pedig megszűnik (Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009 May).

#### **4. A NMD rendszer szabályozása.**

*Maga az NMD rendszer egy folyamatosan működő, konstitutív szabályozó rendszernek tekinthető, vagy meghatározott stimulusok (pl. hormon, környezet) esetleg a fejlődés, differenciáció befolyásolják-e a rendszer működését?*

Korábban azt gondolták, hogy az NMD konstitutívan működik, de a legújabb eredmények szerint az NMD intenzitása szabályozottan változhat. Mivel az NMD egy a transláció terminációjával szorosan kapcsolt folyamat, így minden translációt gátló hatás az NMD aktivitásra is hat. Ez alapvetően passzív hatás. Kiderült azonban, hogy -legalábbis emlősökben- az NMD aktivitás szigorúan regulált, pl. a mioblaszt differenciáció során az NMD aktivitás csökken. A UPF1 fehérje szerepet játszik egy másik RNS-alapú szabályozó rendszer, a Stauffen-mediated decay (SDN) működésében is. Azaz az NMD és SDN rendszerek versenyeznek a UPF1-ért. Mivel a mioblaszt differenciáció során az SDN aktivitás nő, az NMD rendszer a UPF1 relatív hiánya miatt gyengül. Az NMD aktivitás a neuron differenciáció során is drámaian változik. A differenciáció során aktiválódik egy neuron-specifikus miRNS, a miR128, amely negatívan regulálja a UPF1-et. Az NMD hatékonyságának csökkenése nagyszámú neuron-specifikus mRNS stabilizálódását, ezáltal expressziójuk növekedését eredményezi. A miR128 kiváltotta UPF1 szint csökkenés elengedhetetlen a normál neuron differenciációhoz. Valószínű az is, hogy a humán NMD faktorok szintje erősen sejttípus függő (mRNP quality control goes regulatory. Mühlemann O, Jensen TH. *Trends Genet.* 2012 Feb). A növényi NMD szabályozásáról keveset tudni. Az autoregulációs ciklusok leírása mellett, megkezdjük a növényi NMD aktivitás szabályozásának vizsgálatát is. NMD riporter vonalakban akarjuk tesztelni, hogyan is változik az NMD aktivitás fejlődési, illetve környezeti szignálok hatására. Sajnos ebben a programban megelőzték bennünket, több csoport is igazolta, hogy bakteriális fertőzésre a növényi NMD aktivitás gyengül. Kiderült az is, hogy a bakteriális patogének elleni hatékony védekezési válaszhoz szükséges gének jelentős részét az NMD negatívan regulálja, így az NMD gyengülése a megfelelő védekezési válaszok kialakulásához elengedhetetlen. (Arabidopsis Plants Having Defects in Nonsense-mediated mRNA Decay Factors UPF1, UPF2, and UPF3 Show Photoperiod-dependent Phenotypes in Development and Stress Responses. Shi C, Baldwin IT, Wu J. *J Integr Plant Biol.* 2011 Dec., Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. Jeong HJ, Kim YJ, Kim SH, Kim YH, Lee IJ, Kim YK, Shin JS. *Plant Cell Physiol.* 2011 Dec;).

#### **5. A NMD rendszer molekuláris funkciója.**

*A növényi gének milyen hányada, hány %-a áll(hat) NMD szabályozás alatt?*

Az annotált *Arabidopsis* gének ~20%-a -elvb- NMD célpont. Az NMD mutánsokban azonban a fehérjét kódoló gének alig 1-2%-a mutat szignifikánsan megemelkedett expressziót. Az eltérés két okra vezethető vissza, (1) a vizsgált NMD mutánsokban az NMD részlegesen aktív maradt, (2) számos NMD cis elemet hordozó transzkriptum képes elkerülni az NMD választ. Ez sokféle módon történhet, az egyik lehetőség a translációs readthrough.

Az egyetlen megbízhatónak tűnő NMD-mutáns expressziós analízis alapján nincs olyan fehérjekódoló génkategória, amely jellegzetesen NMD szabályozás alatt állna. Ugyanakkor a mRNS-szerű, de nem-kódoló transzkriptumok kb. egyharmada NMD reguláció alatt áll (Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in *Arabidopsis*. Kurihara et.al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb), ami azt valószínűsíti, hogy

ezeknek az egyébként funkcionálisan szinte egyáltalán nem jellemzett transzkriptumoknak a regulációja a növényi NMD egyik fő feladata.

## 6. A NMD rendszer biológiai funkciója.

A UPF1 és az SMG7 null-mutánsok az egyedfejlődés korai szakaszában elpusztulnak, míg a UPF3 null-mutáns, illetve a UPF1 vagy SMG7 hipomorf allélok hasonló fenotípust mutatnak. Ezek a vonalak lassabban nőnek, leveleik epinasztiásak, a mutáns növények gyakran sterilek. Kiderült azonban, hogy a fenotípus rendkívül erősen környezetfüggő, alacsonyabb hőmérsékleten, kisebb páratartalom esetén, illetve hosszú nappalon a fenotípus erős, míg magasabb hőmérsékleten, nagyobb humiditás esetén vagy rövid nappalon, a fenotípus eltűnik (Arabidopsis Plants Having Defects in Nonsense-mediated mRNA Decay Factors UPF1, UPF2, and UPF3 Show Photoperiod-dependent Phenotypes in Development and Stress Responses. Shi C, Baldwin IT, Wu J. *J Integr Plant Biol.* 2011 Dec.). Valószínű, hogy a fenotípusért döntően a megemelkedett szalicilsav szint, illetve a megemelkedett patogén válasz aktivitás a felelős (Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. Jeong HJ, Kim YJ, Kim SH, Kim YH, Lee IJ, Kim YK, Shin JS. *Plant Cell Physiol.* 2011 Dec;). Feltehető, hogy a növényi NMD egyes core faktorai -az NMD mellett- más folyamatokban is részt vesznek, de ezt eddig csak egyetlen esetben igazolták. Riha és munkatársai bizonyították, hogy az SMG7 az NMD mellett részt vesz a meiózis szabályozásában is (Meiotic progression in Arabidopsis is governed by complex regulatory interactions between SMG7, TDM1, and the meiosis I-specific cyclin TAM. Bulankova P, Riehs-Kearnan N, Nowack MK, Schnittger A, Riha K. *Plant Cell.* 2010 Nov). Állatokban az EJC az NMD-n mellett számos folyamatban vesz részt, így szerepet játszik a splicing, a mRNS export, a transzkript lokalizáció, és a transzláció szabályozásában is. Bizonyosra vehető, hogy a feltételezett növényi EJC komponensek is részt vesznek más biokémiai folyamatokban is, de az ezt alátámasztó kísérletes eredmények egyelőre hiányoznak, vagy nem könnyen értelmezhetőek. A MAGO és az Y14 talán az intron-tartalmú mRNS-ek transzlációjának serkentésében vesz részt (Functional interconnections of Arabidopsis exon junction complex proteins and genes at multiple steps of gene expression. Mufarrege EF, Gonzalez DH, Curi GC. *J Exp Bot.* 2011 Oct), míg a 4A3 a hipoxia válaszában játszhat szerepet (Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. Koroleva OA, Calder G, Pendle AF, Kim SH, Lewandowska D, Simpson CG, Jones IM, Brown JW, Shaw PJ., *Plant Cell.* 2009 May). Physalis-ban a MAGO a csészelevél fejlődésben játszik szerepet (PFMAGO, a MAGO NASHI-like factor, interacts with the MADS-domain protein MPF2 from Physalis floridana. He C, Sommer H, Grosardt B, Huijser P, Saedler H., *Mol Biol Evol.* 2007 May). Az EJC T-DNS vonalak hiánya arra utal, hogy a haploid életszakaszhoz az EJC fehérjék nélkülözhetetlenek.